

PERTANIAN

PENGHAMBATAN ACTINOMYCETES TERHADAP *ERWINIA CAROTOVORA* SUBSP. *CAROTOVORA* SECARA IN VITRO

(Inhibition of Actinomycetes Against Erwinia carotovora subsp. carotovora in Vitro)

Ariestya Ayu Meda Sallytha, Hardian Susilo Addy*, Paniman Ashna Mihardjo

Fakultas Pertanian, Universitas Jember
Jalan Kalimantan Kampus Tegalboto Jember 68121
*E-mail : hsaddy.faperta@unej.ac.id

ABSTRACT

The efforts to increase tobacco production is influence by the limiting factor in the field, such as plant disease. One of them is due to interference by Hollow Stalk disease caused by *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Some studies suggest that Actinomycetes can be used as a biological control for controlling Hollow Stalk on tobacco as it potentially produce antibiotics. This study was aimed to obtain isolates of Actinomycetes in the rhizospheric and soil in the area of tobacco plantation and to learn the inhibition of Actinomycetes against *E. carotovora* in vitro. The research was carried out with various stages, such as exploration and isolation of Actinomycetes, culturing *E. carotovora*, and testing of the inhibition in vitro through double-layer assay method. Exploration isolates of Actinomycetes resulted 12 isolates from four locations: Mumbulsari, Sukorambi, Sukowono and Gebang. Microbial colonies that grew white, not shiny with small diameter 3-20 mm was chosen for antibiotics test. Based on testing antibiosis against *E. carotovora*, all isolates Actinomycetes antagonistic properties showed formation of inhibition zone diameter of inhibition despite variations in individual isolates. Inhibition zone was vary with range of 18.30 mm to 49.95 mm of diameter that was shoing by isolate of Sukorambi 3 and Mumbulsari 2, respectively. The variation of the difference of differences of power allegedly inhibitory antagonism of each isolate Actinomycetes while also differences in produce antibiotics as inhibitors of the growth of pathogens.

Keywords: *Erwinia carotovora*; Actinomycetes; Antibiotics

ABSTRAK

Usaha peningkatan produksi tembakau dipengaruhi adanya faktor pembatas di lapangan, seperti penyakit tumbuhan. Salah satu diantaranya adalah akibat gangguan penyakit busuk batang berlubang yang disebabkan oleh *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. Beberapa penelitian menyatakan bahwa Actinomycetes dapat dimanfaatkan sebagai pengendali hayati untuk mengendalikan bakteri busuk batang berlubang pada tembakau karena berpotensi menghasilkan antibiotik. Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat Actinomycetes pada daerah rizosfer dan tanah di pertanaman tembakau dan mengetahui daya hambat Actinomycetes terhadap *E. carotovora* secara in vitro. Penelitian ini dilakukan dengan berbagai tahapan, seperti eksplorasi dan isolasi Actinomycetes, kultur *E. carotovora*, dan pengujian daya hambat secara in vitro dilakukan melalui pendekatan antibiosis dengan metode *double-layer assay*. Isolat Actinomycetes hasil eksplorasi yang berhasil diisolasi sebanyak 12 isolat dari empat lokasi yaitu Mumbulsari, Sukorambi, Sukowono dan Gebang. Koloni mikroba yang tumbuh berwarna putih, tidak mengkilap dengan diameter kecil 3-20 mm. Berdasarkan pengujian antibiosis terhadap *E. carotovora*, semua isolat Actinomycetes memiliki sifat antagonis ditunjukkan dengan terbentuknya zona penghambatan meskipun terdapat variasi diameter penghambatan pada masing-masing isolat. Diameter zona hambatan yang terbentuk berkisar 18,30 mm yang ditunjukkan oleh isolat Actinomycetes asal Sukorambi 3 hingga 49,95 mm yang ditunjukkan oleh isolat Actinomycetes asal Mumbulsari dua. Adanya variasi perbedaan penghambatan diduga adanya perbedaan daya antagonisme dari masing-masing isolat Actinomycetes selain itu juga perbedaan dalam menghasilkan antibiotik sebagai penghambat pertumbuhan patogen.

Kata Kunci: *Erwinia carotovora*; Actinomycetes; Antibiotik

How to cite: Sallytha AAM, HS Addy, PA Mihardjo. 2014. Penghambatan actinomycetes terhadap *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* secara in vitro. *Berkala Ilmiah Pertanian* 1(4): 70-72.

PENDAHULUAN

Salah satu faktor pembatas di lapangan dalam peningkatan produksi kualitas dan kuantitas tembakau yaitu adanya serangan hama dan penyakit (Hartana, 1987). Salah satunya adalah penyakit busuk batang berlubang yang disebabkan oleh *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* (Semangun, 2001). Tetapi penyakit ini belum efektif dikendalikan menggunakan pestisida kimiawi maka alternatif pengendalian perlu dikembangkan yaitu pengendalian menggunakan agen hayati. Salah satu mikroba yang memiliki potensi sebagai agen pengendali hayati adalah Actinomycetes yang diketahui memiliki kemampuan dalam menghasilkan berbagai antibiotik seperti streptomycin, aureomisin, oleandomisin, spiramycin dan eritromisin (Suwandi, 1993). Actinomycetes juga dapat mengendalikan beberapa patogen seperti *Sclerotium rolfsii* Saac. penyebab penyakit rebah semai pada tanaman kedelai dan *F. oxysporum* f.sp. *cubense* penyebab penyakit layu fusarium pada pisang (Muhibuddin, 2010; Sudarma, 2010). Penelitian ini bertujuan untuk mendapatkan isolat Actinomycetes pada daerah rizosfer di pertanaman tembakau dan mengetahui daya hambat Actinomycetes terhadap *E. carotovora* secara in vitro.

METODE PENELITIAN

A. Eksplorasi dan Isolasi Actinomycetes

Pengambilan sampel tanah dilakukan di daerah sentra tembakau di Jember, yaitu Sukorambi, Gebang, Sukowono dan Mumbulsari. Isolasi dilakukan dari sampel tanah rizosfer tanaman tembakau pada tanah dengan cara Hot Treatment pada sampel tanah dengan suhu 121°C, satu atm menggunakan autoklaf selama satu jam kemudian dibuat seri pengenceran 10^{-1} sampai dengan 10^{-10} . Sebanyak 50µl suspensi pada pengenceran 10^{-9} dan 10^{-10} ditumbuhkan pada YPGA. Untuk identifikasi sampai tingkat genus dilakukan dengan pengamatan karakteristik secara morfologi menggunakan metode culture slide, pengujian Gram dan pengujian Hipersensitif (HR) pada daun tembakau.

B. Kultur E. carotovora subsp. carotovora

Bakteri *E. carotovora* subsp. *carotovora* diperbanyak dengan cara digoreskan pada medium YPGA dalam cawan Petri dengan menggunakan jarum ose yang kemudian diinkubasikan pada suhu ruang selama 24 jam.

C. Pengujian Daya Hambat dan Mekanisme secara In Vitro

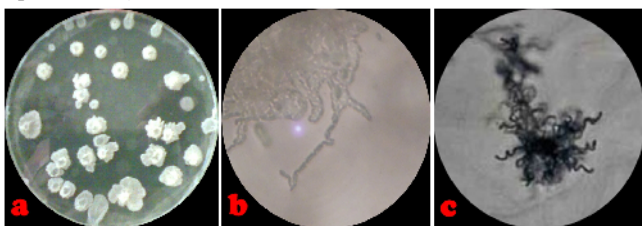
Pengujian antibiosis dilakukan dengan cara menumbuhkan tiga titik biakan isolat Actinomycetes pada medium YPGA, diinkubasikan 24 jam. Cawan Petri dibalik dan pada tutupnya ditetesi dengan satu ml kloroform kemudian dibiarkan sampai menguap (2 jam). Menuangkan empat ml agar air 0,6% suhu 50°C yang sudah dicampuri dengan suspensi 0,2 ml *E. carotovora* ke dalam biakan Actinomycetes, kemudian inkubasikan selama 24 jam dan diamati zona hambatan yang terbentuk.

Untuk mekanisme mekanisme penghambatan, media agar dalam zona hambatan diambil secara aseptis dengan scalpel steril kemudian dimasukkan dalam tabung reaksi berisi lima ml air pepton 1% dan dihanguskan dengan jarum preparat. Air pepton berisi agar kemudian dishaker menggunakan rotary shaker selama 24 jam pada suhu ruang. Air pepton yang menjadi keruh setelah 24 jam menunjukkan mekanisme penghambatan Actinomycetes bersifat bakteristatik. Air pepton yang tetap bening maka mekanisme penghambatan bersifat bakterisidal.

HASIL

A. Mikrob Actinomycetes

Koloni mikrob yang tumbuh pada media YPGA berwarna putih, tidak mengkilap, dengan diameter kecil (3–20 mm) (Gambar 1a), koloninya tumbuh sangat lambat dan melekat erat pada permukaan agar setelah diinkubasikan selama 7 hari. Hasil pengamatan secara mikroskopik menunjukkan adanya pembentukan miselium bercabang (Gambar 1b) yang sporanya berbentuk rantai spiral (Gambar 1c), bergam positif dan menunjukkan respon negatif pada uji hipersensitif (data tidak dipublikasikan).



Gambar 1. Morfologi koloni Actinomycetes pada media YPGA(a); miselium Actinomycetes (b), rantai spora hasil pengamatan mikroskopik menggunakan metode culture slide pada media YPGA (c)

B. Bakteri Busuk Batang Berlubang Pada Tembakau

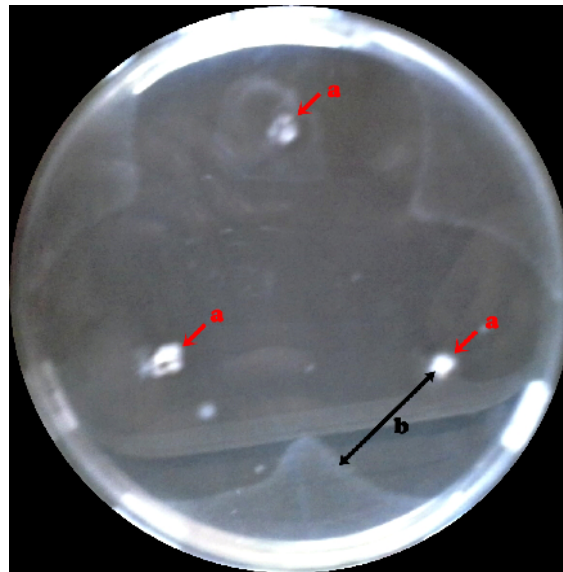
Koloni berwarna putih susu, berlendir, mengkilap, tepi rata dan tampak cembung setelah diinkubasi selama 24 jam (Gambar 2). Hasil ini menunjukkan kesamaan dengan ciri koloni bakteri *E. carotovora* yang ditemukan oleh Arwiyanto and Hartana (1999) dan Addy (2007), bahwa bakteri *E. carotovora* berwarna bening sampai putih susu, mengkilap, bulat dan bertepi rata.



Gambar 2. Morfologi koloni *E. carotovora* pada media YPGA

C. Pengujian Daya Hambat dan Mekanisme secara In Vitro

Hasil uji antibiosis menunjukkan bahwa 12 isolat memiliki kemampuan dalam menghambat pertumbuhan bakteri busuk batang berlubang. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya zona penghambatan (zona bening) (Gambar 3), meskipun terdapat variasi diameter penghambatan pada masing-masing isolat (Tabel 1).



Gambar 3. Zona hambatan yang terbentuk pada uji antagonis Actinomycetes (a) dengan bakteri *E. carotovora* pada media YPGA ditandai dengan zona bening (b)

Tabel 1. Diameter Zona Hambatan Actinomycetes terhadap *E. carotovora*

Asal Isolat Actinomycetes	Rerata Zona Hambatan (mm)*
Gebang 1	33.65
Gebang 2	30.50
Gebang 3	45.30
Sukorambi 1	34.80
Sukorambi 2	44.99
Sukorambi 3	18.30
Sukowono 1	42.70
Sukowono 2	34.63
Sukowono 3	42.77
Mumbulsari 1	37.30
Mumbulsari 2	49.95
Mumbulsari 3	44.30

Keterangan : Hasil anova menunjukkan hasil tidak berbeda nyata maka tidak dilanjutkan pada uji BNT taraf 5%

PEMBAHASAN

Dari hasil penelitian yang telah dilakukan diperoleh hasil isolasi Actinomycetes sebanyak 12 isolat. Koloni mikrob yang tumbuh pada media YPGA berwarna putih, tidak mengkilap, dengan diameter kecil (3–20 mm) (Gambar 1a), koloninya tumbuh sangat lambat dan melekat erat pada permukaan Agar setelah diinkubasikan selama 7 hari. Karakteristik tersebut mirip dengan yang diamati oleh Agrios (1997), bahwa koloni Actinomycetes seperti *Streptomyces* pada media biakan berukuran kecil (diameter 1-10 mm), pada awalnya permukaan agak licin dan lama kelamaan terdapat jaringan miselium yang menyebabkan permukaan koloni bertepung.

Hasil pengamatan mikroskopik menunjukkan bahwa isolat tersebut dapat dikelompokkan ke dalam Actinomycetes dikarenakan karakteristik koloninya mirip dengan kelompok Actinomycetes yaitu adanya pembentukan miselium bercabang (Gambar 1b) yang sporanya berbentuk

rantai spiral. Spora tersebut tersusun dalam bentuk kumparan yang menggulung atau berpilin (Gambar 1c). Holt *et al.* (1994) menyatakan bahwa kelompok Actinomycetes membentuk miselium bercabang setelah 24 jam pada media agar dan koloni mulai tampak setelah 3-4 hari sedangkan spora pada aerial miselium dapat terbentuk setelah 7-14 hari. Cook and Baker (1974), menambahkan bahwa koloni Actinomycetes tumbuh sangat lambat, meski tumbuh lambat Actinomycetes mampu membentuk spora tahan didalam tanah dan juga memiliki kemampuan menghasilkan antibiotik.

Untuk mengetahui karakteristik isolat Actinomycetes lebih rinci, maka sebanyak 12 isolat tersebut diuji karakteristik fisiologi dan biokimia. Pada pengujian gram semua isolat mikroba yang diuji menunjukkan tidak ada pembentukan lendir lengket dari campuran koloni bakteri dan KOH 3% yang dapat terangkat lebih dari satu cm oleh jarum ose. Kondisi ini dikenal dengan reaksi negatif dan mikroba yang diuji tergolong Gram Positif (Lelliot and Stead, 1987). Pada pengujian hipersensitif pada daun tembakau daun tembakau yang diinfiltrasikan dengan suspensi isolat Actinomycetes pada kerapatan 10^8 cfu/ml tidak menunjukkan terjadinya nekrosis pada jaringan daun hingga 48 jam setelah inkubasi. Hal ini membuktikan bahwa mikroba yang diuji bukan bakteri patogen tanaman. Hal ini sesuai dengan pendapat Kerr and Gibb (1997) apabila bakteri yang diuji berupa bakteri patogen maka akan terjadi nekrosis pada daun tembakau, dimana terjadi hubungan yang compatible antara patogen dan tembakau. Apabila suspensi bakteri yang diinfiltrasikan pada daun tembakau tidak merangsang respon hipersensitif maka dapat digunakan sebagai inokulan untuk pemacu pertumbuhan tanaman (Lelliot and Stead, 1987). Bahkan, penelitian yang dilakukan oleh Papuangan (2009) menjelaskan bahwa suspensi isolat Streptomyces tidak menunjukkan reaksi positif pada pengujian respon hipersensitif pada daun tembakau.

Sebanyak 12 isolat Actinomycetes yang berhasil diisolasi selanjutnya diuji kemampuan antagonismenya terhadap bakteri busuk batang berlubang. Berdasarkan hasil pengujian, semua isolat Actinomycetes memiliki sifat antagonis terhadap bakteri busuk batang berlubang. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya zona penghambatan, meskipun terdapat variasi diameter penghambatan pada masing-masing isolat. Diameter zona hambatan yang terbentuk bervariasi yaitu berkisar 18,30 mm yang ditunjukkan oleh Actinomycetes Sukorambi 3 hingga 49,95 mm yang ditunjukkan oleh isolat Actinomycetes Mumbulsari 2.

Diduga variasi diameter zona hambatan yang terbentuk dikarenakan adanya perbedaan daya antagonisme dan menghasilkan antibiotik dari masing-masing isolat Actinomycetes dalam penghambatan pertumbuhan patogen. Actinomycetes mengeluarkan antibiotik yang peka terhadap bakteri gram negatif antara lain Streptomycin dan Neomicin (Anugrahwati, 2011).

Untuk mekanisme penghambatannya, hasil pengujian dari 12 isolat Actinomycetes menunjukkan bahwa tidak terjadi perubahan kekeruhan pada air pepton 1% atau kondisinya tetap bening. Mekanisme penghambatan yang terjadi seperti ini diduga bersifat bakteriosidal. Menurut Masnillah dkk. (2006) bahwa kondisi tersebut dapat terjadi pada isolat mikroba antagonis yang sifat antibiosisnya melalui mekanisme bakteriosidal.

Berdasarkan penelitian dan analisis data penelitian yang telah dilakukan dapat disimpulkan bahwa koloni Actinomycetes yang didapat dari daerah rizosfer di pertanaman tembakau berwarna putih, tidak mengkilap, dengan diameter kecil (3–20 mm). Pada pengujian antagonis Actinomycetes terhadap bakteri busuk batang berlubang secara in vitro, semua isolat Actinomycetes memiliki sifat antagonis terhadap *E. carotovora*. Hal ini ditunjukkan dengan terbentuknya zona hambatan (zona bening) yang bervariasi berkisar 18,30 mm hingga 49,95 mm.

Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut untuk mengetahui, spesies dan jenis antibiotik yang dihasilkan oleh isolat Actinomycetes yang dalam penelitian ini berpotensi untuk mengendalikan bakteri busuk batang berlubang pada tembakau

UCAPAN TERIMA KASIH

Peneliti mengucapkan banyak terimakasih kepada semua Bapak dan Ibu dosen Jurusan Hama dan Penyakit Tumbuhan yang telah memberikan sumbangsih dalam hal akademik dan Ir. Rachmi Masnillah M.Si yang telah

memberikan bantuan materiil selama penelitian serta semua pihak yang telah mendukung terselesainya penelitian yang dilakukan oleh penulis.

DAFTAR PUSTAKA

- Addy HS. 2007. Pengaruh sumber mineral terhadap penekanan *Erwinia carotovora* oleh pseudomonas pendar-fluor secara in vitro. *J. Hama dan Penyakit Tumbuhan Tropika* 7(2):117-124.
- Agrios GN. 1997. *Plant Pathology. Ed ke-4*. San Diego: Academic Press.
- Anugrahwati DR. 2011. Aktifitas actinomycetes endofit sebagai bionematisida terhadap *Meloidogyne javanica*. *Crop Agro* 1(2):114-126.
- Arwiyanto T, I Hartana. 1999. Penyakit Batang Berlubang pada Tembakau Cerutu di Indonesia. Makalah pendukung pada Kongres Nasional XV dan Seminar Ilmiah PFI. 16-18 September 1999. Purwokerto.
- Cook RJ, KF Baker. 1974. *Biological Control of Plant Pathogens*. San Francisco: W.A. Freeman & Co.
- Hartana I. 1987. Penyakit-penyakit Utama pada Tanaman Tembakau di Jawa Timur dan Usaha Pengendaliannya. Kongres Nasional IX PFI. Surabaya
- Holt JG, NR Krieg, PAH Sneath, JT Staley, ST Williams. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 9th Edition*. Baltimor: Williams & Wilkins.
- Kerr A, K Gibb. 1997. *Bacteria and phytoplasma as plant parasites*. In : *Plant Pathogen and Plant Disease*, J.F. Brown and H.J. Ogle (eds). Armidale: Australian Plant Pathology Society.
- Lelliot dan Stead. 1987. *Methods For the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*. Oxford. Blackwell Sci. Publ.
- Masnillah R, PA Mihadja, Restuningsih. 2006. Pemanfaatan *Bacillus subtilis* sebagai biopestisida untuk pengendalian hayati bakteri penyebab penyakit layu pada tomat. *Jurnal Mapeta* 8(2):87-94.
- Muhibuddin A. 2010. Antagonisme Streptomyces Terhadap *Sclerotium rolfsii* Saac. Penyebab Penyakit Rebah Semai Pada Tanaman Kedelai. Jurusan Hama Penyakit Tumbuhan. Fakultas Pertanian. Universitas Brawijaya
- Papuangan N. 2009. Aktivitas Penghambatan Senyawa Antimikrob *Streptomyces* spp Terhadap Mikroba Patogen Tular Tanah Secara In Vitro dan In Planta. Pasca Sarjana. (Tesis). Bogor: Program Pascasarjana Institut Pertanian Bogor
- Semangun H. 2001. *Pengantar Ilmu Penyakit Tumbuhan*. Yogyakarta. Gadjah Mada University Press.
- Sudarma MI. 2010. Seleksi Dan Pemanfaatan Actinomycetes Sebagai Mikroba Antagonis Yang Ramah Lingkungan Terhadap *Fusarium oxysporum* f.sp *cubense* Secara In Vitro. Fakultas Pertanian. Universitas Udayana
- Suwandi U. 1993. Skrining mikroorganisme penghasil antibiotika. *Cermin Dunia Kedokteran* 89(48):46-48